

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000年11月30日 (30.11.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/71160 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 39/395, 45/00, 31/519, 31/506, 31/517, 31/505, 31/5415, 31/155, A61P 37/06, 29/00, 19/02 // C07D 475/08, 403/10, 471/04, 239/95, 487/04, 239/48, C07C 279/26
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三共株式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03324
- (72) 発明者; および
- (22) 国際出願日: 2000年5月24日 (24.05.2000)
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 芹澤伸記 (SERIZAWA, Nobufusa) [JP/JP]. 市川公久 (ICHIKAWA, Kimihisa) [JP/JP]. 好田宏子 (YOSHIDA, Hiroko) [JP/JP]; 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/143033 1999年5月24日 (24.05.1999) JP
- (74) 代理人: 大野彰夫, 外(OHNO, Akio et al.); 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: MEDICINAL COMPOSITIONS CONTAINING ANTI-Fas ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗Fas抗体を含有する医薬組成物

(57) Abstract: Novel medicinal compositions containing anti-Fas antibody which are useful as preventives or remedies for autoimmune diseases or rheumatoid arthritis. More particularly, medicinal compositions containing as the active ingredients antihuman Fas antibody having an activity of inducing apoptosis and a compound having an antagonism to folic acid or an effect of inhibiting dihydrofolate reductase. By using these medicinal compositions, the content of anti-Fas antibody can be reduced in preventives or remedies for autoimmune diseases or rheumatoid arthritis containing anti-Fas antibody. Thus, the possibility of the appearance of the tolerance in the patient's body due to the expression of an antibody against the anti-Fas antibody, etc., which makes it possible to provide excellent preventives or remedies usable in long-term administration.

(57) 要約:

本発明は、自己免疫疾患または慢性関節リウマチの予防または治療剤として有用な、抗Fas抗体を含有する新規医薬組成物を提供するものである。

具体的には、アポトーシス誘導活性を有する抗ヒトFas抗体および葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。

本発明によれば、抗Fas抗体を含有する自己免疫疾患または慢性関節リウマチの予防または治療剤において、抗Fas抗体の使用量を低減することができ、これにより、患者体内において該抗Fas抗体に対する抗体の発現等による耐性が表れる可能性を低減できるため、長期間の投与に堪える優れた予防または治療剤を提供することが可能である。



WO 00/71160 A1



(81) 指定国 (国内): AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN,
KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA.

添付公開 類:
— 国際調査報告

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

抗F a s 抗体を含有する医薬組成物

〔技術分野〕

本発明は、自己免疫疾患または慢性関節リウマチの予防または治療に有効な新規医薬組成物に関する。

〔背景技術〕

生体内において、正常な細胞交代のために生じる生理的な細胞死はアポトーシスと呼ばれ、病理的な細胞死である壊死（ネクローシス）とは区別されている（Kerr, et al. (1972) Br. J. Cancer 26, 239 参照）。いわゆるプログラム細胞死は、生体内において予め死滅するべくプログラム化されている、ある種の細胞にみられる細胞死であるが、アポトーシスもそのひとつである。アポトーシスにおいては細胞表面の湾曲、核クロマチンの凝縮、染色体DNAの断片化等の現象が特徴的に観察される。

アポトーシスは、リンパ球（T細胞およびB細胞）の分化において、自己抗原を認識する細胞を排除する役割を果たしている。いわゆる自己免疫疾患の発症は、リンパ球分化におけるアポトーシスの不全によって自己反応性リンパ球が生じることによるものと考えられている（中山敬一ら（1995）Mebio 12（10），79-86参照）。

このようなアポトーシスに関与する分子としてはF a s [Yonehara, S. et al. (1989) J. Exp. Med. 169, 1747-1756 参照]をはじめとして、腫瘍壊死因子受容体（Tumor Necrosis Factor Receptor）[Loetscher, H. et al. (1990) Cell 61, 351-359 参照]、CD40 [Tsubata, T. et al. (1993) Nature 364, 645-648 参照] やパーフォリン／グランザイムA [Jenne, D. E. et al. (1988) Immunol. Rev. 103, 53-71 参照] など種々の分子が同定されてきた。F a sは細胞表面に存在する膜貫通型タンパク質で、F a sリガンドと呼ばれるタンパク質

がその細胞外領域に結合するとその細胞にアポトーシスを誘導する。

抗Fasモノクローナル抗体の中には、Fasリガンド同様に細胞のアポトーシスを誘導する細胞障害活性を有するものが存在することから、自己免疫疾患、エイズおよび腫瘍の治療剤となり得ると報告されている（特開平2-237935号および特表平5-503281号参照）。

一方リウマチ、特に慢性関節リウマチは、内的および外的要因によって引き起こされる種々の免疫学的異常を伴う、滑膜細胞の増殖を基礎病変とする疾患であり、炎症性細胞浸潤および骨の侵食を伴う滑膜細胞の増殖障害と考えられている。慢性関節リウマチにおける罹患関節を中心とする組織破壊は、炎症性滑膜細胞からのサイトカインの産生異常がその成因であると考えられている。リウマチ患者の関節の状態を調べると、滑膜細胞が異常に増殖しており、滑膜絨毛の増生や滑膜細胞の多層化などが観察される（Daniel J. McCarty (1985) in "Arthritis and allied conditions, A textbook of rheumatology" 10th Edition, Lea & Febiger 参照）。現在実施されているリウマチの薬物療法には、専らステロイド等の抗炎症剤または免疫調節剤等が用いられているが、こうした滑膜細胞の異常増殖を薬物で抑制することができれば、その薬物はリウマチ治療剤として有用であると考えられる。

ところで、リウマチにおける滑膜細胞の増殖は無制限に生じるものではなく、自発抑制することが知られている（Daniel J. McCarty (1985) in "Arthritis and allied conditions, A textbook of rheumatology" 10th Edition, Lea & Febiger 参照）。さらに最近、リウマチ患者の滑膜細胞にアポトーシスが起こること、滑膜細胞膜上にFas抗原が発現していることが明らかとなった。中島ら（Nakajima, T., et al. (1995) Arthritis Rheum. 38, 485-491参照）および青野ら（第38回日本リウマチ学会抄録集(1994) 487頁および平成6年日本癌学会総会記事(1994) 338頁参照）は、細胞障害活性を有する抗ヒトFas抗体をリウマチ患者由来の異常増殖した滑膜細胞に加えることにより、滑膜細胞にアポトーシスが誘導されるか否かについて検討した結果、リウマチ患者の異常増殖した滑膜

細胞はリウマチ患者以外の滑膜細胞と比較してアポトーシスが起こる割合が高いことを見いだしている。従って、抗ヒトF a s 抗体は、リンパ球のみならず、異常増殖している滑膜細胞も選択的にアポトーシスへと導くことができ、リウマチ治療剤として有用であると考えられる。

抗ヒトF a s マウスモノクローナル抗体は既に数種得られており (Yonehara, S., et al (1989) J. Exp. Med. 169, 1747-1756, (1989) ; SCIENCE, 245, 301-305, (1989) などを参照)、また、前記のように、該抗体がリウマチ患者の滑膜細胞にイン・ビトロでアポトーシスを誘導することも報告されている (第38回日本リウマチ学会抄録集(1994) 487頁および平成6年日本癌学会総会記事(1994) 338頁参照)。さらに、自己免疫疾患モデル動物やリウマチ性関節炎モデル動物でその治療効果および安全性が示された抗F a s 抗体も見出されている (欧州特許公開0909816号公報参照)。

一方、腫瘍壊死因子 α (TNF α) に対するモノクローナル抗体c A 2とメトトレキサートの併用により慢性関節リウマチ患者に対する治療効果が上昇することが知られている (カルデン、第7回国際リウマチシンポジウム(1998) 抄録12-13頁) が、抗F a s 抗体とメトトレキサート等の相乗作用については全く知られていない。

自己免疫疾患や慢性関節リウマチの予防または治療剤として有用な抗F a s 抗体の効果を増強させるような化合物があれば、該化合物と抗F a s 抗体とを併用することにより、抗F a s 抗体の使用量を抑えることができる。これにより、患者体内において該抗F a s 抗体に対する抗体の発現等による耐性が表れる可能性を低減できるため、そのような抗F a s 抗体の効果を増強させるような化合物と抗F a s 抗体とを組み合わせ、長期間の投与に堪える優れた予防または治療剤の開発が望まれていた。

[発明の開示]

本発明は、アポトーシス誘導活性を有する抗ヒト Fas 抗体および葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する医薬組成物に関する。好ましくは、該抗ヒト Fas 抗体がモノクローナル抗体 CH11、マウス-マウスハイブリドーマ HFE7A (FERM BP-5828) が産生する抗ヒト Fas モノクローナル抗体 HFE7A またはそれらのヒト化抗体であることを特徴とするものである。また、上記葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物は、メトトレキセート、エダトレキセート、エピロプリム、イオメトレキソール、ピリトレキシム、トリメトトレキセート、プロジモプリム、MX-68、N-[4-[3-(2,4-ジアミノ-6,7-ジヒドロ-5H-シクロペンタ[d]ピリミジン-5-イル)プロピル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸、N-[[5-[2-(2-アミノ-1,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-4-オキソピリド[2,3-d]ピリミジン-6-イル)エチル-2-チエニル]カルボニル]-L-グルタミン酸、(R)-N-[[5-[2-(2-アミノ-1,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-4-オキソピリド[2,3-d]ピリミジン-6-イル)エチル-2-チエニル]カルボニル]-L-グルタミン酸、N-((2,4-ジアミノ-3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロピリド[2,3-d]ピリミジン-6-イル)エチル)-2-チエニルカルボニル-L-グルタミン酸、(S)-2-[[[4-カルボキシ-4-[[4-[(2,4-ジアミノ-6-プテリジニル)メチル]アミノ]ベンゾイル]アミノ]ブチル]アミノ]-カルボニル]ベンゾイル酸、N-[4-[3-(2,4-ジアミノ-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)プロピル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸、2,4-ジアミノ-6-(N-(4-(フェニルスルホニル)ベンジル)メチルアミノ)キナゾリン、2,4-ジアミノ-5-[4-[3-(4-アミノフェニル-4-スルホニルフェニルアミノ)プロポキシ]-3,5-ジメトキシベンジル]ピリミジン、N-[4-[4-(2,4-ジアミノ-5-ピリミジニル)ブチル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸、N-[4-[3-(2,4-ジアミノ-5-ピリミジニル)プロピル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸、N-[4-[2-(2,4-ジアミノ-6-プテリジニル)エチル]ベンゾイル]-4-メチレン-DL-グルタミン酸および N-(1-メチルエチル)-N' [3-(2,4,5-トリクロロフェノキシ)プロポキシ]イミドジカルボニミジックジアミドヒドロクロリド (PS15) からなる群より選択されるものであることが好ましく、中でもメトトレキセートが最も好ましい。

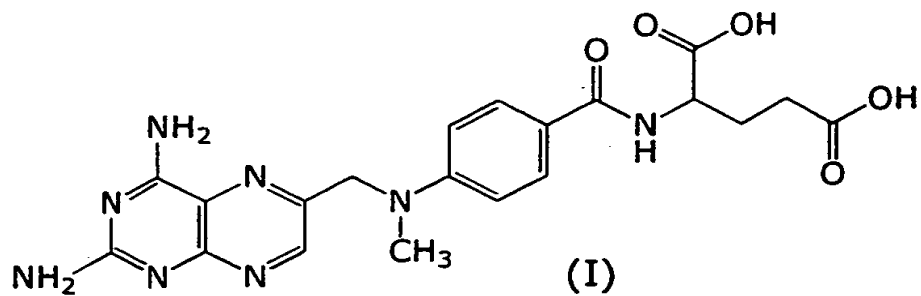
本発明者らは、アポトーシスを誘導活性を有する抗F a sモノクローナル抗体の効果が、葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物を共存させることにより上昇することを見出し、本発明を完成させた。

本発明において、「アポトーシス誘導活性」とは、細胞膜表面にF a sを発現している細胞に対し、そのF a sに結合することによってその細胞のアポトーシスを導くことができる活性をいう。

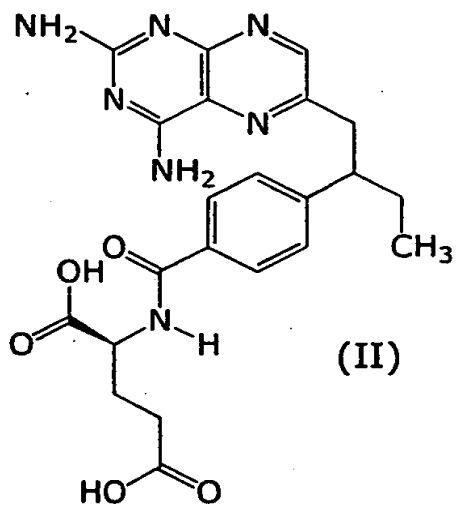
本発明の医薬組成物の第一の有効成分として用いられる抗ヒトF a s抗体は、ヒトF a sに特異的に結合でき、かつアポトーシス誘導活性を有するようなものであればよい。そのような抗ヒトF a s抗体として、好ましくは抗ヒトF a sモノクローナル抗体CH11およびマウスーマウスハイブリドーマHFE7A (FERM BP-5828) が産生する抗ヒトF a sモノクローナル抗体HFE7Aもしくはそれらのヒト化抗体 (欧州特許公開0909816号公報) を挙げることができるが、本発明はこれらに限定されない。なお、これら抗ヒトF a sモノクローナル抗体の遺伝子組換え体も、これらモノクローナル抗体と同等の効果を奏するものであり、本発明の抗ヒトF a sモノクローナル抗体に包含される。また本発明においては、遺伝子組換え技術により、上記抗F a sモノクローナル抗体のF a sに対する結合能やアポトーシス誘導活性を損なわずに、ヒトに対する免疫原性を低減するように改変された、いわゆるヒト化抗体を用いることもできる。

本発明において「葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物」とは、細胞内のDNA合成において必須の過程である葉酸の代謝を拮抗的に阻害する活性を有する、薬理的に許容可能な化合物をいう。好適には、以下に記載する化合物を挙げることができる：

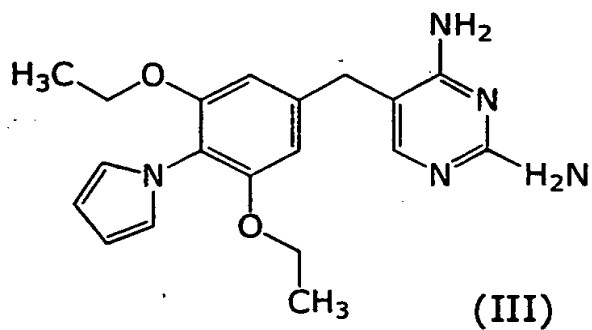
メトトレキセート (下記式 (I))



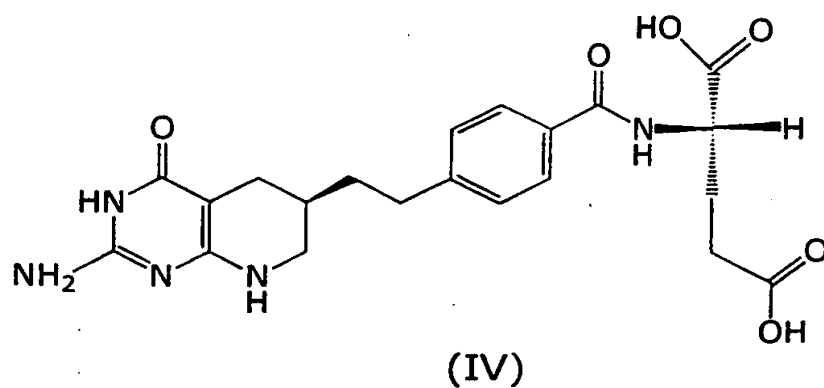
エダトレキセート（英国特許公報GB 2058770 B参照、下記式（I I））



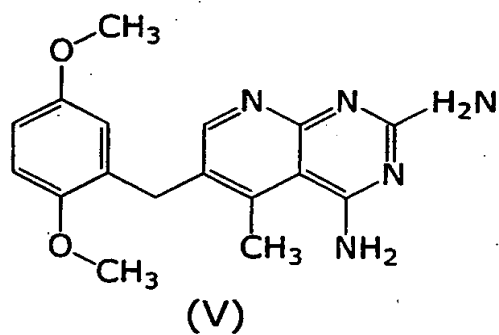
エピロプリム（国際特許出願WO92/8461号公報参照、下記式（I I I））



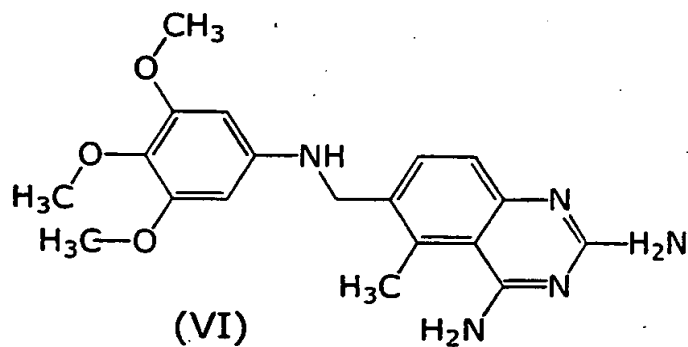
イオメトレキソール（国際特許出願WO 86/5181号公報参照、下記式（I V））



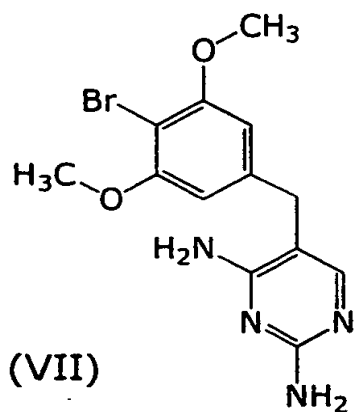
ピリトレキシム（欧州特許21292号公報参照、下記式（V））



トリメトレキセート（英国特許公報GB 1345502参照、下記式（VI））

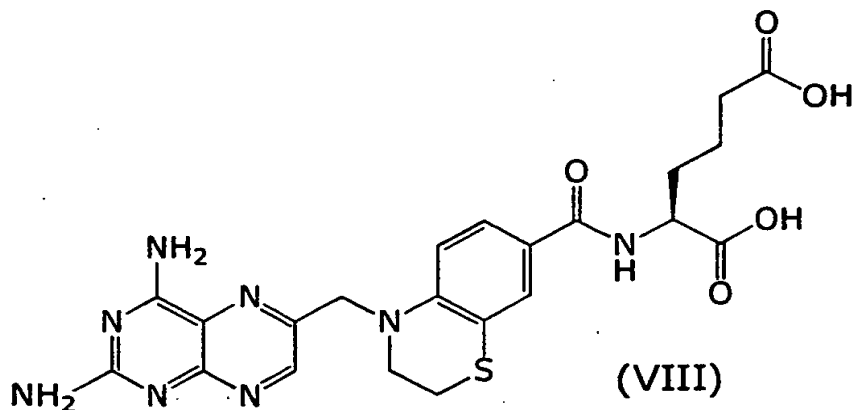


プロジモプリム (英国特許公報 G B 1 4 4 9 3 8 7 参照、下記式 (V I I))



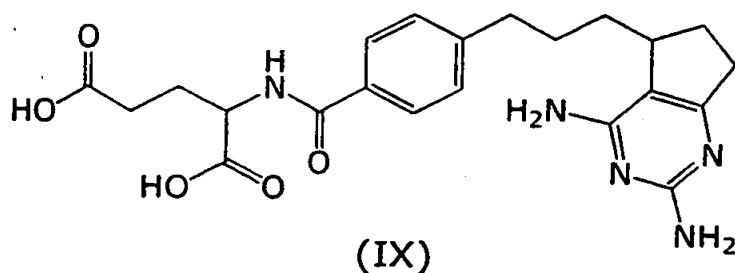
(VII)

MX-68 (国際特許出願 WO 97 / 3 4 6 0 6 号公報参照、下記式 (V I I I))

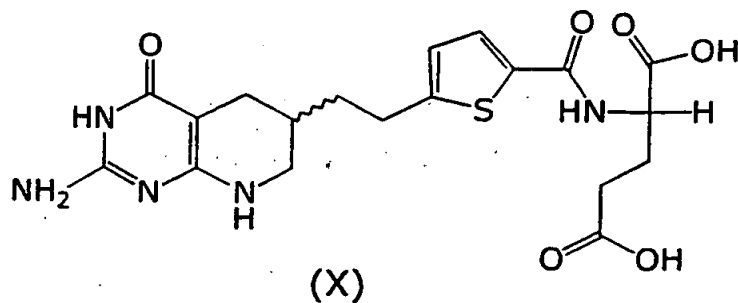


(VIII)

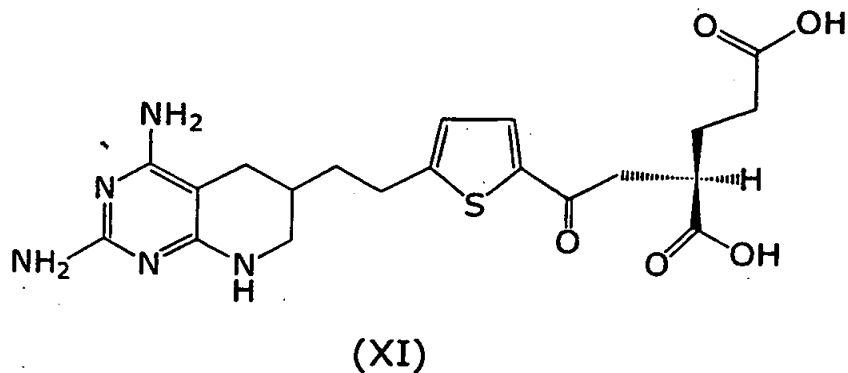
N-[4-[3-(2,4-ジアミノ-6,7-ジヒドロ-5H-シクロペンタ[d]ピリミジン-5-イル)プロピル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸 (J. Med. Chem. (1994) 37, 1616-1624、下記式 (I X))



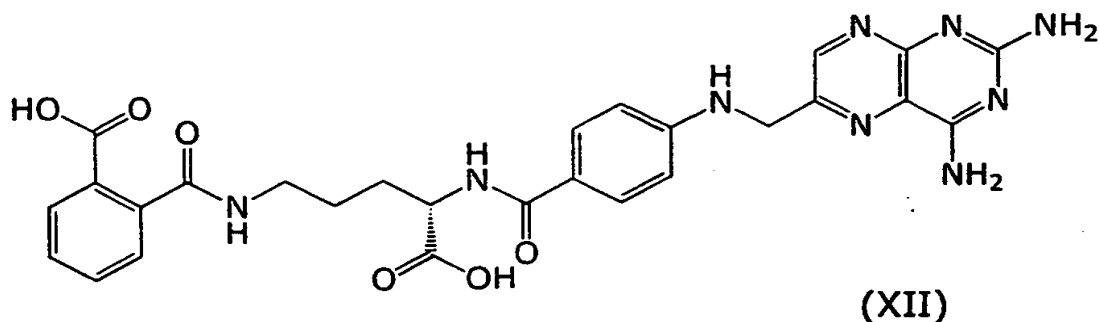
N-[[5-[2-(2-アミノ-1,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-4-オキソピリド[2,3-d]ピリミジン-6-イル)エチル-2-チエニル]カルボニル]-L-グルタミン酸 (欧州特許 3 4 3 8 0 1 号公報参照、下記式 (X))



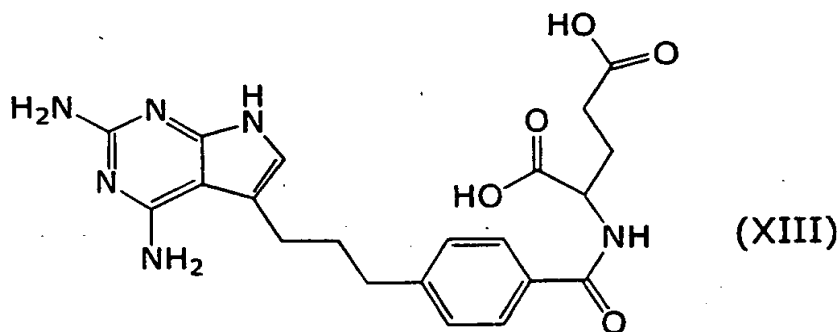
N-((2,4-ジアミノ-3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロピリド[2,3-d]ピリミジン-6-イル)エチル)-2-チエニルカルボニル-L-グルタミン酸 (米国癌研究学会第 8 8 回年会 (1997)抄録番号660参照、下記式 (X I))



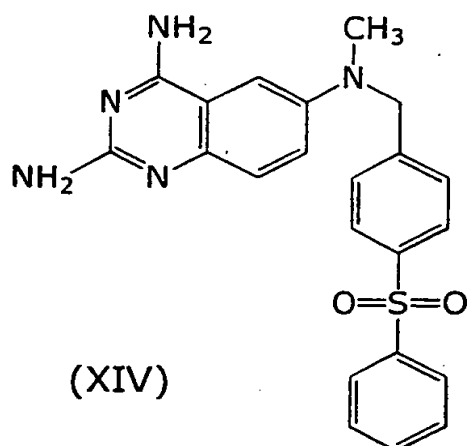
(S)-2-[[[4-カルボキシ-4-[[4-[[[(2,4-ジアミノ-6-プテリジニル)メチル]アミノ]ベンゾイル]アミノ]ブチル]アミノ]カルボニル]ベンゾイル酸 (欧州特許 3 4 5 3 0 8 号公報参照、下記式 (X I I))



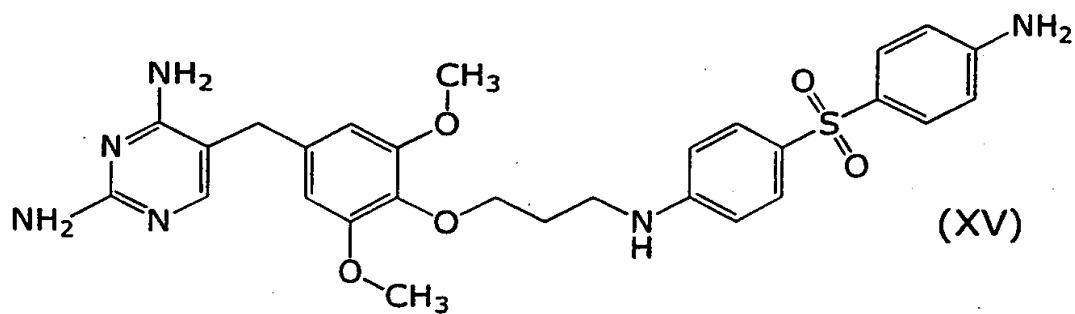
N-[4-[3-(2,4-ジアミノ-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)プロピル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸 (欧州特許 3 3 4 6 3 6 号公報参照、下記式 (X I I I))



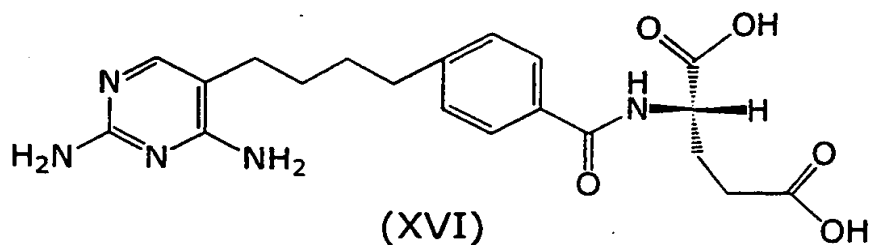
2,4-ジアミノ-6-(N-(4-(フェニルスルホニル)ベンジル)メチルアミノ)キナゾリン (米国癌研究学会年会(1992)抄録番号2458参照、下記式 (X I V))



2,4-ジアミノ-5-[4-[3-(4-アミノフェニル-4-スルホニルフェニルアミノ)プロポキシ]-3,5-ジメトキシベンジル]ピリミジン (欧州特許 2 3 1 8 8 8 号公報参照、下記式 (X V))

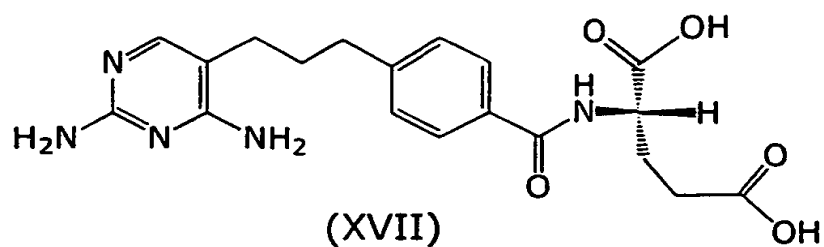


N-[4-[4-(2,4-ジアミノ-5-ピリミジニル)ブチル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸 (国際特許出願 WO 9 5 / 9 8 4 5 号公報参照、下記式 (X V I))

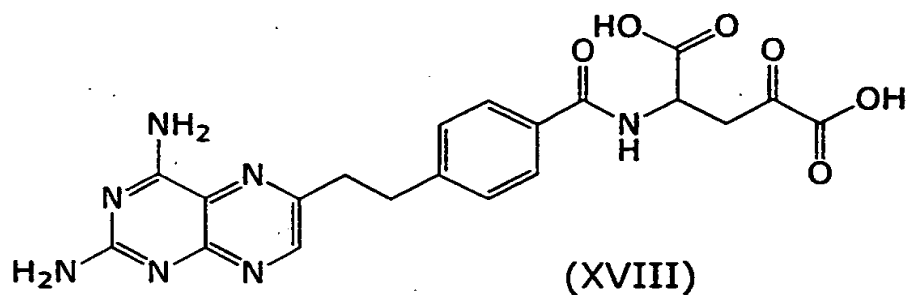


N-[4-[3-(2,4-ジアミノ-5-ピリミジニル)プロピル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸

(下記式 (国際特許出願WO 95 / 9845 号公報参照、X V I I))

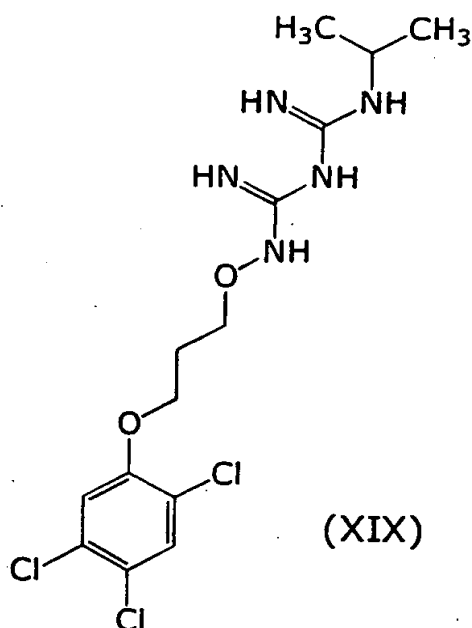


N-[4-[2-(2,4-ジアミノ-6-プテリジニル)エチル]ベンゾイル]-4-メチレン-DL-グルタミン酸 (国際特許出願WO 91 / 10666 号公報参照、下記式 (X V I I I))



および

N-(1-メチルエチル)-N' [3-(2,4,5-トリクロロフェノキシ)プロポキシ]イミドジカルボニミジックジアミドヒドロクロリド (P S 15) (国際特許出願WO 93 / 16037 号公報参照、下記式 (X I X))



(XIX)

これらの化合物はいずれも、葉酸拮抗作用乃至はジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有することが知られている。上記化合物群のうち、本発明の医薬組成物に含有せしめる化合物として最適なものはメトトレキサートである。

本発明の医薬組成物は、F a sを発現している細胞にアポトーシスを誘導する活性を有するような抗F a sモノクローナル抗体と、葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物とを適宜混合したものを製剤化することによって得ることができる。

抗F a sモノクローナル抗体は、例えば抗原としてヒトF a sの細胞外領域を含む分子を使用して、当該技術分野において周知の方法により作製することができる。例えば、本発明の医薬組成物に含有される抗F a sモノクローナル抗体として好適なものの一つであるモノクローナル抗体HFE7Aは、F a sノックアウトマウスをヒトF a sで免疫し、該マウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を融合することにより得られるハイブリドーマを培養することにより得ることができる。具体的には、以下に記載の方法に従う。

モノクローナル抗体の製造にあたっては、少なくとも下記のような作業工程が必要である。すなわち、

- (a) 抗原として使用する生体高分子の精製、
- (b) 抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、
- (c) 骨髄腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、
- (d) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、
- (e) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、
- (f) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）、
- (g) 場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、またはハイブリドーマを移植した動物の飼育、
- (h) このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、およびその認識特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、等である。

以下、抗Fasモノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞およびミエローマを使用することもできる。

(a) 抗原の精製

抗原としては、ヒトFasの細胞外領域とマウスインターロイキン3受容体（以下「IL3R」という）の細胞外領域 [Nishimura, Y. et al. (1995) J. Immunol. 154, 4395-4403参照] との融合タンパク質の発現ベクターp hFas-AIC2をサル由来細胞株COS-1に導入し発現させ、部分精製することによって得られる組換えタンパク質（以下「組換えヒトFas」という）が有効である。p hFas-AIC2は、ヒトFasとマウスIL3Rの融合タンパク質をコードするDNAを、動物細胞用発現ベクターpME18Sに組み込むことにより作製できる。ただし、FasをコードするDNA、ベクター、宿主等はこれらに限定されない。

具体的には、p h F a s - A I C 2でC O S - 1細胞を形質転換して得られた形質転換株を培養し、その培養上清中に産生されるヒトF a sとマウスI L 3 Rの融合タンパク質を、リソースQカラム（商標名：ファルマシア社製）を用いたイオン交換クロマトグラフィーを実施することにより、組換えF a sを部分精製することができる。

また、ヒト細胞株の細胞膜上に存在するF a sそのものを精製したのもも抗原として使用することができる。さらに、F a sの一次構造は公知である〔Itoh, N., et al. (1991) Cell 66, 233-243 参照〕ので、当業者に周知の方法により、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むことからなるペプチドを化学合成し、これを抗原として使用することもできる。

(b) 抗体産生細胞の調製

工程(a)で得られた抗原と、フロインドの完全または不完全アジュバント、またはカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物としては、F a sノックアウトマウスが最も好適に用いられるが、そのようなマウスは千住らの文献〔Senju, S., et al (1996) International Immunology 8, 423 参照〕に記載する方法により作出することができる。

マウス免疫の際の免疫原投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射いずれでもよいが、皮下注射または腹腔内注射が好ましい。

免疫は、一回、または、適当な間隔で（好ましくは1週間から5週間間隔で）複数回繰返し行なうことができる。その後、免疫した動物の血清中の抗原に対する抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給原として用いれば、以後の操作の効果を高めることができる。一般的には、最終免疫後3～5日後の動物由来の抗体産生細胞を後の細胞融合に用いることが好ましい。

ここで用いられる抗体価の測定法としては、放射性同位元素免疫定量法（以下「R I A法」という）、固相酵素免疫定量法（以下「E L I S A法」という）、

蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、および操作の自動化の可能性などの観点から、RIA法またはELISA法がより好適である。

本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、精製または部分精製したFasをELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係なタンパク質、例えばウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）により覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗Fas抗体を結合させる。さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。

(c) ミエローマの調製工程

ミエローマとしては、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)ミエローマ株P3X63Ag8U.1(P3-U1) [Yelton, D.E. et al. Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7(1978)]、P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1) [Kohler, G. et al. European J. Immunology, 6, 511-519 (1976)]、Sp2/O-Ag14 (SP-2) [Shulman, M. et al. Nature, 276, 269-270 (1978)]、P3X63Ag8.653 (653) [Kearney, J. F. et al. J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979)]、P3X63Ag8(X63) [Horibata, K. and Harris, A. W. Nature, 256, 495-497 (1975)]などを用いることが好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば8-アザグアニン培地[RPMI-1640培地にグルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、およびウシ胎児血清（以下「FCS」という）を加えた培地に8-アザグアニンを加えた培地]、イスコフ改変ダルベッコ培地(Iscove's Modified Dulbecco's Medium; 以下「IMDM」という)、またはダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium; 以下「DMEM」という)で継代培養するが、細胞融合の3~4日前に正常培地[例えば、10% FCSを含むASF104培地(

味の素（株）社製）] で継代培養し、融合当日に 2×10^7 以上の細胞数を確保しておく。

(d) 細胞融合

抗体産生細胞は、形質細胞、およびその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾、リンパ節、末梢血、またはこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾細胞が最も一般的に用いられる。

最終免疫後、所定の抗体価が得られたマウスから抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、抗体産生細胞である脾細胞を調製する。この脾細胞と工程 (c) で得られたミエローマを融合させる手段として現在最も一般的に行われているのは、細胞毒性が比較的少なく融合操作も簡単なポリエチレングリコールを用いる方法である。この方法は、例えば以下の手順よりなる。

脾細胞とミエローマとを無血清培地（例えばRPMI 1640）、またはリン酸緩衝生理食塩液（以下「PBS」という）でよく洗浄し、脾細胞とミエローマの細胞数の比が5 : 1 ~ 10 : 1 程度になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈殿した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら1 ml の50% (w/v) ポリエチレングリコール（分子量1000~4000）を含む無血清培地を滴下する。その後、10 ml の無血清培地をゆっくりと加えた後遠心分離する。再び上清を捨て、沈殿した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（以下「HAT」という）液およびマウスインターロイキン-2（以下「IL-2」という）を含む正常培地（以下「HAT培地」という）中に懸濁して培養用プレート（以下「プレート」という）の各ウェルに分注し、5% 炭酸ガス存在下、37℃で2週間程度培養する。途中適宜HAT培地を補う。

(e) ハイブリドーマ群の選択

上記ミエローマ細胞が、8-アザグアニン耐性株である場合、すなわち、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）欠損

株である場合、融合しなかった該ミエローマ細胞、およびミエローマ細胞どうしの融合細胞は、HAT含有培地中では生存できない。一方、抗体産生細胞どうしの融合細胞、あるいは、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマは生存することができるが、抗体産生細胞どうしの融合細胞には寿命がある。従って、HAT含有培地中での培養を続けることによって、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマのみが生き残り、結果的にハイブリドーマを選択することができる。

コロニー状に生育してきたハイブリドーマについて、HAT培地からアミノプテリンを除いた培地（以下「HT培地」という）への培地交換を行う。以後、培養上清の一部を採取し、例えば、ELISA法により抗Fas抗体価を測定する。ただし、ELISA用の抗原として上記融合タンパク質を用いる場合は、マウスIL3受容体の細胞外領域に特異的に結合する抗体を産生するクローンを選択しないように、該クローンを除外する操作が必要である。そのようなクローンの有無は、例えばマウスIL3受容体またはその細胞外領域を抗原としたELISA等により確認することができる。

以上、8-アザグアニン耐性の細胞株を用いる方法を例示したが、その他の細胞株もハイブリドーマの選択方法に応じて使用することができ、その場合使用する培地組成も変化する。

(f) クローニング

工程(b)の記載と同様の方法で抗体価を測定することにより、特異的抗体を産生することが判明したハイブリドーマを、別のプレートに移しクローニングを行う。このクローニング法としては、プレートの1ウェルに1個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニピレーターによって1個ずつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって1個の細胞を分離する「ソータクローン」などが挙げられるが、限界希釈法が簡便でありよく用いられる。

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを2～4回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗F a sモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。さらに、マウスF a sに結合する抗体を産生するハイブリドーマを同様の方法で選択することにより、抗F a sモノクローナル抗体産生細胞を得る。このとき使用されるマウスF a sとしては、例えばマウスF a sの細胞外領域とマウスI L 3受容体の細胞外領域との融合タンパク質をコードするDNAの発現プラスミドベクター pME18S-mF a s-A I C [Nishimura, Y. et al. (1995) J. Immunol. 154, 4395-4403参照] を培養動物細胞に導入して発現させた融合タンパク質や、精製マウスF a s、またはマウスF a sを細胞表面に発現している細胞を使用できる。

なお、本発明の医薬組成物に含有せしめる有効成分として好適な抗F a sモノクローナル抗体の産生細胞であるマウスーマウスハイブリドーマHFE7Aは日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業研究所に1997年2月20日付けで国際寄託され、受託番号FERM BP-5828が付されている。したがって、例えばマウスーマウスハイブリドーマHFE7Aを用いて抗体を調製する場合は、工程(f)までを省略して、以下に記載する工程(g)から抗体の調製を行うことができる。

(g) ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をHT培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、あるいはスピナー培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲル濾過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、本発明の予防または治療剤が有効成分として含有する抗F a sモノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス(例えば、上記のBALB/c)、あるいはNu/Nuマウスの腹腔内で該ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明の予防または治療剤が有効成分として含有する抗F a sモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット(例えば、MAbTrap GIIキット;ファルマシア社製)等を利用することもできる。

かくして得られるモノクローナル抗体は、ヒトおよびマウスのF a sに対して高い抗原特異性を有する。

(h) モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプおよびサブクラスの決定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー (Ouchterlony) 法、E L I S A法、またはR I A法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、E L I S A法またはR I A法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット（例えば、マウスタイパーキット；バイオラッド社製）等を利用することもできる。

さらに、タンパク質の定量は、フォーリンロウリー法、および280nmにおける吸光度 $[1.4 (OD_{280}) = \text{イムノグロブリン } 1 \text{ mg/ml}]$ より算出する方法により行うことができる。

次に、本発明の医薬組成物に含有せしめる有効成分として好適な抗F a sモノクローナル抗体の重鎖または軽鎖をコードするDNAは、上記抗F a sモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを調製し、該mRNAを逆転写酵素でcDNAに変換してから、該抗体の重鎖または軽鎖をコードするDNAをそれぞれ単離することにより得られる。

mRNAの抽出にあたっては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法なども採用しうるが、グアニジン・チオシアネート・塩化セシウム法が好適である。細胞からのmRNAの調製は、まず全RNAを調製し、該全RNAからオリゴ(dT)セルロース

やオリゴ (d T) ラテックスビーズ等のポリ (A) +RNA 精製用担体を用いて精製する方法、または細胞ライセートから該担体を用いて直接精製する方法により実施できる。全 RNA の調製方法としては、アルカリシヨ糖密度勾配遠心分離法 [Dougherty, W. G. and Hiebert, E. (1980) *Virology* 101, 466-474 参照]、グアニジンチオシアネート・フェノール法、グアニジンチオシアネート・トリフルオロセシウム法、フェノール・SDS 法等も採用し得るが、グアニジンチオシアネートおよび塩化セシウムを用いる方法 [Chirgwin, J. M., et al. (1979) *Biochemistry* 18, 5294-5299 参照] が好適である。

上記のごとくして得られたポリ (A) +RNA を鋳型として、逆転写酵素反応により一本鎖 cDNA を合成した後、この一本鎖 cDNA から二本鎖 cDNA を合成することができる。この方法としては S1 ヌクレアーゼ法 [Efstratiadis, A., et al. (1976) *Cell* 7, 279-288 参照]、グブラー・ホフマン法 [Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983) *Gene* 25, 263-269 参照]、オカヤマ・バーグ法 [Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 161-170 参照] 等を採用し得るが、本発明においては、一本鎖 cDNA を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (以下「PCR」という) [Saiki, R. K., et al. (1988) *Science* 239, 487-49 参照] を行なう、いわゆる RT-PCR 法が好適である。

このようにして得られた二本鎖 cDNA をクローニングベクターに組み込み、得られた組換えベクターを大腸菌等の微生物に導入して形質転換させ、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性等を指標として形質転換体を選択することができる。大腸菌の形質転換は、ハナハン法 [Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580 参照]、すなわち塩化カルシウムや塩化マグネシウムまたは塩化ルビジウムを共存させて調製したコンピテント細胞に、該組換え DNA ベクターを加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしてプラスミドを用いる場合は、上記の薬剤耐性遺伝子を有することが必要である。また、プラスミド以外のクローニングベクター、例えばラムダ系のファージ等を用いることも可能である。

上記により得られた形質転換株から、目的の抗ヒトF a s 抗体の各サブユニットをコードする cDNA を有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。なお、上記 R T - P C R 法により目的の cDNA を特異的に増幅した場合は、これらの操作を省略することが可能である。

(1) ポリメラーゼ連鎖反応を用いる方法

目的タンパク質のアミノ酸配列の全部または一部が解明されている場合、該アミノ酸配列の一部に対応するセンスストランドとアンチセンスストランドのオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応 [Saiki, R. K., et al. (1988) Science 239, 487-49 参照] を行ない、目的の抗ヒトF a s 抗体重鎖あるいは軽鎖サブユニットをコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、例えば抗ヒトF a s モノクローナル抗体 H F E 7 A を産生するハイブリドーマ (F E R M B P - 5 8 2 8) の mRNA より逆転写酵素反応にて合成した cDNA を用いることができる。

このようにして調製したDNA断片は、市販のキット等を利用して直接プラスミドベクターに組み込むこともできるし、該断片を³²P、³⁵Sあるいはビオチン等で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはブランクハイブリダイゼーションを行なうことにより目的のクローンを選択することもできる。

例えば、本発明の医薬組成物に含有せしめる有効成分として好適なモノクローナル抗体HFE7Aは、イムノグロブリンG1（以下「IgG1」という）分子であり、重鎖（ $\gamma 1$ 鎖）、軽鎖（ κ 鎖）の各サブユニットからなる複合体である。これらの各サブユニットの部分アミノ酸配列を調べる方法としては、電気泳動やカラムクロマトグラフィーなどの周知の方法を用いて各サブユニットを単離してから、自動プロテインシーケンサー（例えば、島津製作所（株）製 PPSQ-10）等を利用してそれぞれのサブユニットのN末端アミノ酸配列を解析する方法が好適である。

上記のごとくして得られた目的の形質転換株より、抗ヒトF a sモノクローナル抗体タンパク質の各サブユニットをコードするcDNAを採取する方法は、公知の方法 [Maniatis, T., et al. (1982) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 参照] に従い実施できる。例えば細胞よりベクターDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAより目的とするサブユニットをコードするDNA領域を切り出すことにより行うことが可能である。

(2) 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

目的タンパク質のアミノ酸配列の全部または一部が解明されている場合（該配列は、複数個連続した特異的配列であれば、目的タンパク質のどの領域のものでもよい）、該アミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し（この場合、コドン使用頻度を参考に推測されるヌクレオチド配列、または考えられるヌクレオチド配列を組み合わせた複数個のヌクレオチド配列のいずれも採用でき、また後者の場合イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる）、これをプローブ（ ^{32}P 、 ^{35}S あるいはビオチン等で標識する）として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を選別する。

このようにして得られるDNAの配列の決定は、例えばマキシムーギルバートの化学修飾法 [Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) in "Methods in Enzymology" 65, 499-576参照] やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 [Messing, J. and Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276参照] 等により実施することができる。

また近年、蛍光色素を用いた自動塩基配列決定システムが普及している（例えばパーキンエルマージャパン社製シーケンスロボット "CATALYST 800" およびモデル373ADNAシーケンサー等）。

こうしたシステムを利用することで、DNAヌクレオチド配列決定操作を能率よく、かつ安全に行うことも可能である。このようにして決定された本発明のDNAの各ヌクレオチド配列、および重鎖および軽鎖の各N末端アミノ酸配列デー

タから、本発明のモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の全アミノ酸配列を決定することができる。

アミノ酸配列中の任意の一つもしくは二つ以上のアミノ酸を欠失させた改変体を作製するにあたっては、カセット変異法〔岸本利光、“新生化学実験講座2・核酸III 組換えDNA技術” 242-251参照〕などに従うことができる。

この様な各種のDNAは、例えばフォスファイト・トリエステル法〔Hunkapiller, M., et al. (1984) Nature 310, 105-111参照〕等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンは、それ自体が公知であり、その選択も任意でよく、例えば使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定することも可能である。これらヌクレオチド配列コドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変異導入法（サイトスペシフィック・ミュータジェネシス）〔Mark, D. F., et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666参照〕等に従うことができる。

また、あるDNAが本発明の医薬組成物に含有せしめる有効成分として好適な抗Fasモノクローナル抗体の重鎖または軽鎖をコードするDNAとハイブリダイズするか否かは、例えば、該DNAを、ランダムプライマー法〔Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) Anal. biochem. 132, 6-13 参照〕やニックトランスレーション法〔Maniatis, T., et al. (1982) in "Molecular Cloning A laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 参照〕等に従い〔 α - ^{32}P 〕-dCTP等で標識したプローブDNAを用いて、以下に記載するような実験を行うことにより調べることができる。

まず調べようとするDNAを、例えばニトロセルロース膜やナイロン膜等に吸着させ、必要に応じてアルカリ変性等の処理を行なってから、加熱あるいは紫外線等により固相化させる。この膜を、 $6\times\text{SSC}$ （ $1\times\text{SSC}$ は0.15M 塩化ナトリウム、0.015M クエン酸三ナトリウム溶液）と5% デンハート

溶液、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含むプレハイブリダイゼーション溶液に浸し、55℃で4時間以上保温してから、先に調製したプローブを同様のプレハイブリダイゼーション溶液に最終比活性 1×10^6 cpm/ml となるように加え、60℃で一晩保温する。その後、膜を室温下で $6 \times \text{SSC}$ で5分間の洗浄する操作を数回繰り返し、さらに $2 \times \text{SSC}$ で20分間洗浄してから、オートラジオグラフィーを行う。

上記のような方法を利用して、任意の cDNA ライブラリーまたはゲノムライブラリーから、本発明の医薬組成物に含有せしめる有効成分として好適な抗 Fas モノクローナル抗体の重鎖または軽鎖をコードする DNA とハイブリダイズする DNA を単離することができる [Maniatis, T., et al. (1982) in "Molecular Cloning A laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 参照]。

上記のごとくして得られる各 DNA を、それぞれ発現ベクターに組み込むことにより、原核生物または真核生物の宿主細胞に導入し、それらの宿主細胞で各遺伝子を発現させることが可能である。

原核細胞の宿主としては、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 等が挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で発現させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコン、すなわち複製起点および *lac* UV5 等のプロモーター配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換すればよい。またベクターは、形質転換した細胞での表現形質による選択性を付与することができる配列を有するものが望ましい。例えば大腸菌としては、*E. coli* K12 株由来の JM109 株等がよく用いられ、ベクターとしては、一般に pBR322 や pUC 系のプラスミドがよく用いられるが、これらに限定されず、公知の各種の菌株およびベクターをいずれも使用できる。またプロモーターとしては、大腸菌においては、トリプトファン (*trp*) プロモーター、ラクトース (*lac*) プロモーター、トリプトファン・ラクトース (*tac*) プロモーター、リボプロテイン (*lpp*) プロモーター、バクテリオファージ由来のラムダ (λ) PL プロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子 Tu (*tufB*) プロモーター

などが挙げられるが、これらに限定されない。

枯草菌としては、例えば207-25株が好ましく、ベクターとしてはpTUB228 [Ohmura, K., et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93 参照] 等が用いられるが、これに限定されない。またプロモーターとしては、枯草菌 α アミラーゼ遺伝子の調節配列がよく用いられ、さらに必要に応じて α アミラーゼのシグナルペプチド配列をコードするDNA配列を連結することにより、菌体外への分泌も可能となる。

真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサル由来の細胞株であるCOS-1 [Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182 参照] 等が用いられる。酵母としては、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) やアルコール発酵性酵母 (*Pichia pastoris*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 等が用いられる。ここに例示したような細胞が一般に宿主細胞としてよく用いられているが、これらに限定されるものではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常は発現させようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAスプライシング部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これにはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr [Subramani, S., et al. (1981) Mol. Cell. Bio. 1, 854-864 参照] 等を例示できるが、これに限定されない。

酵母の発現ベクターとしては、例えばアルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター [Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025 参照] や、ガラクトース代謝系酵素遺伝子 (*gal10* など) のプロモーター [Ichikawa, K., et al. (1993) Biosci. Biotech. Biochem. 57, 1686-1690 参照] 等を利用でき、必要により酵母遺伝子のシグナルペプチド配列をコードするDNA配列を連結することにより、細胞外への分泌も可能となるが、これに限定されるものではない。

宿主細胞としてCOS-1を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS-1において自立増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナル、およびRNAスプライス部位を備えた発現ベクターを用いることができる。該発現ベクターは、DEAE-デキストラン法 [Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308 参照]、リン酸カルシウム-DNA共沈法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) Virology 52, 456-457 参照] および電気穿孔法 [Neumann, E., et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845 参照] などによりCOS-1に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

特に、重鎖をコードするDNAを含むことからなる発現ベクターおよび同軽鎖をコードするDNAを含むことからなる発現ベクターでCOS-1をコ・トランスフェクションすることにより、これらのDNAを同時に発現させ、組換え抗Fas抗体を産生する形質転換体を得ることができる。しかしながら、組換え抗Fas抗体を生産する方法は上記に限定されず、例えば、重鎖および軽鎖のそれぞれをコードするDNAを両方とも保持し、これらを同時に発現させることができる単一の発現ベクターを構築し、該ベクターでCOS-1細胞を形質転換する方法等も用いることができる。

上記で得られる所望の形質転換体は、当業者に周知の方法に従って培養することができ、該培養により、形質転換体細胞内または細胞外に組換え抗Fas抗体が産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS-1の場合、RPMI 1640培地やダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) などの培地に、必要に応じてウシ胎児血清 (FCS) などの血清成分を添加したものを使用できる。

該形質転換体の培養の際の培養温度は、細胞内のタンパク質合成能を著しく低下せしめない温度であればいずれでもよいが、好適には32~42℃、最も好適には37℃で培養する。また必要に応じて、1~10% (v/v) の炭酸ガスを

含む空気中で培養することができる。

上記により形質転換体の細胞内または細胞外に生産される、抗F a s抗体タンパク質を含む画分は、該タンパク質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種公知のタンパク質分離操作法により、分離・精製することができる。かかる方法としては、具体的には例えば通常のタンパク質沈澱剤による処理、限外ろ過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲルろ過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種クロマトグラフィー、透析法、およびこれらの組み合わせ等を採用できる。

上記方法により、容易に高収率、高純度で組換え抗F a s抗体を製造できる。

このようにして作製される組換え抗F a s抗体がF a sと特異的に結合することを確認する方法としては、例えば、マウス免疫時に抗体価の評価を行う場合と同様のELISA法が好適である。

一方、葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する、例えば上記式（I）乃至（XIX）で示される化合物は、それぞれの化合物の説明において参照されている文献の記載に従って得ることができる。その他の化合物が葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有するか否かについても、それら文献において用いられている葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用の確認方法を利用して調べることができる。

本発明の医薬組成物は、自己免疫疾患または慢性関節リウマチ患者に対し、このものを有効成分とする予防または治療剤として使用することができる。かかる予防または治療剤は、種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、または、注射剤、点滴剤、坐薬等による非経口投与を挙げることができる。

本発明の医薬組成物中における、抗ヒトFas抗体および葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物の用量は、用いられるそれぞれの抗体や化合物固有の作用の強さなどによって変化しうる。例えば、抗ヒトFas抗体としてCH11またはHFE7Aを、葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物としてメトトレキセートを用いた場合、本発明の医薬組成物は、好ましくはCH11またはHFE7Aを0.1乃至100 ng/ml、メトトレキセートを0.05乃至5 nM含有する溶液として調製されるが、本発明はこの範囲に限定されるものではない。

その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常、抗ヒトFas抗体の量として、1回0.1 mg乃至1000 mgを皮下注射、筋肉注射または静脈注射によって投与することができる。

上記のようにして調製される本発明の医薬組成物の、自己免疫疾患または慢性関節リウマチの治療における有効性は、本発明の医薬組成物を添加した培地中で細胞（例えば、ヒトリンパ球細胞株HPB-ALL (Morikawa, S., et al. (1978) Int. J. Cancer 21, 166-170参照)、Jurkat (American Type Culture No. TIB-152)、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞等）を培養し、その生存率をMTTアッセイ (Green, L. M., et al. (1984) J. Immunological Methods 70, 257-268参照) や下記実施例で記載するXTTアッセイ等の方法で測定することにより確認することができる。本発明の医薬組成物は、自己免疫疾患の主な原因の一つである自己反応性リンパ球や、慢性関節リウマチ患部において異常増殖している滑膜細胞に対して、抗Fas抗体のみを投与するよりも低用量の抗Fas抗体でアポトーシスを誘導できるので、それら自己免疫疾患または慢性関節リウマチの治療に有効である。これら培養細胞を用いた実験において有効と認められた抗Fas抗体を含む組成物が、実際の自己免疫疾患症状や慢性関節リウマチにおいても有効であることは、欧州特許公開0909816号公報において動物実験モデルを用いた実験結果により示されている。

〔図面の簡単な説明〕

図1は、抗ヒトFasモノクローナル抗体CH11とメトトレキセートとの細胞アポトーシス誘導における相乗効果を示した図である。

図2は、抗ヒトFasモノクローナル抗体HFE7Aとメトトレキセートとの細胞アポトーシス誘導における相乗効果を示した図である。

図3は、メトトレキセート存在下における細胞生存率を示した図である。

〔発明を実施するための最良の形態〕

以下に実施例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

抗Fas抗体として、欧州特許公開0909816号公報に記載の抗ヒトFasモノクローナル抗体HFE7AまたはCH11（（株）医学生物学研究所製）を使用した。

ヒトリンパ球細胞株HPB-ALL（Morikawa, S., et al. (1978) Int. J. Cancer 21, 166-170参照）を10% FCS（ギブコ・ビーアールエル社製）を含むRPMI 1640培地にて、37℃、5% 炭酸ガス存在下で3日間培養し（ 2.5×10^5 細胞/50 μ l）を、96穴マイクロプレート（住友ベークライト（株）社製）の各ウェルに50 μ lずつ分注した。次に、メトトレキセート（シグマ社製）および抗Fas抗体（CH11またはHFE7A、0.001 mg/mlから3倍ずつ段階希釈）を含むRPMI培地50 μ lを、各ウェルに添加し、37℃で培養した。

抗Fas抗体としてCH11を添加したプレートについては、そのまま37℃で一晩培養した。一方、HFE7Aを添加したプレートについては、培養1時間後にRPMI培地で細胞を洗浄した後、RPMI培地で1 μ g/mlに調製した抗マウスIgG抗体（バイオソース社製）を100 μ l/ウェル加えた。37℃

で1時間培養後、無血清RPMI培地で細胞を洗浄後、0.05 nMのメトトレキセートを含むRPMI培地を100 μ l / ウエル加えてから、37℃で一晩培養した。

その後、1 mg / mlのXTT (2, 3-ビス [2-メトキシ-4-ニトロ-5-スルホフェニル] -2H-テトラゾリウム-5-カルボキサニリド イナーソルト: シグマ社製) を含む25 μ MのPMS (フェナジンメトサルフェート: シグマ社製) 50 μ l / ウエル (終濃度250 μ g / ml XTT、5 μ M PMS) を添加した。37℃で3時間培養した後、各ウェルの450 nmの吸光度を測定し、ミトコンドリアの還元能を指標とし、細胞の生存率を算定した。

各ウェルの細胞の生存率を、下記式により算出した:

$$\text{生存率 (\%)} = 100 \times (a - b) / (c - b)$$

(式中、aは被検ウェルの測定値を、bは無細胞ウェルの測定値を、cは抗体無添加のウェルの測定値をそれぞれ表わす)。

その結果、CH11のアポトーシス誘導活性は、0.05 nM以上のメトトレキセート添加によって顕著に上昇することが明らかとなった(図1。なお、図中で「MTX」はメトトレキセートを表す。以下において同じ)。また、HFE7Aのアポトーシス誘導活性も、0.05 nMのメトトレキセート添加によって上昇していた(図2)。なお、抗Fas抗体を添加しない、メトトレキセート単独添加の条件では、細胞の生存率はほとんど変化しなかった(図3)。

以上の結果から、メトトレキセート添加により、抗Fas抗体によるアポトーシス誘導活性が増強され、従来より低用量の抗Fas抗体投与により自己免疫疾患の原因細胞の数を減らすことができることが示された。

製剤例

本発明の予防または治療剤は、抗ヒトFas抗体と葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物とを水またはそれ以外の薬理学的に許容

し得る溶液に溶解した無菌性溶液または懸濁液のアンプルとして使用に供される。具体的には例えば、抗ヒトF a s 抗体 0.5 mg および最終的に0.05 nM となる量のメトトレキサートを1リットルの注射用水に溶解し、無菌的にアンプルに分注、封入する。

また、無菌粉末製剤（抗ヒトF a s 抗体と葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物とを凍結乾燥するのが好ましい）をアンプルに充填しておき、使用時に薬理的に許容し得る溶液で希釈してもよい。

〔産業上の利用の可能性〕

以上述べたごとく、本発明により、自己免疫疾患や慢性関節リウマチの予防または治療剤として有用な新規医薬組成物が提供された。本発明によれば、葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物と抗ヒトF a s 抗体とを併用することにより、抗F a s 抗体の使用量を低減することができる。これにより、患者体内において該抗F a s 抗体に対する抗体の発現等による耐性が表れる可能性を低減できるため、本発明の医薬組成物は、長期間の投与に堪える優れた自己免疫疾患や慢性関節リウマチの予防または治療剤として有用である。

請求の範囲

1. アポトーシス誘導活性を有する抗ヒトFas抗体および葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する医薬組成物。
2. アポトーシス誘導活性を有する抗ヒトFas抗体がモノクローナル抗体CH11、HFE7Aまたはそれらのヒト化抗体であることを特徴とする、請求の範囲第1項記載の医薬組成物。
3. アポトーシス誘導活性を有する抗ヒトFas抗体がモノクローナル抗体CH1.1またはそのヒト化抗体であることを特徴とする、請求の範囲第1項または第2項記載の医薬組成物。
4. アポトーシス誘導活性を有する抗ヒトFas抗体が、マウスーマウスハイブリドーマHFE7A (FERM BP-5828) が産生する抗ヒトFasモノクローナル抗体HFE7Aまたはそのヒト化抗体であることを特徴とする、請求の範囲第1項または第2項記載の医薬組成物。
5. 葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物が、メトトレキサート、エダトレキサート、エピロプリム、イオメトレキソール、ピリトレキシム、トリメトトレキサート、プロジモプリム、MX-68、N-[4-[3-(2,4-ジアミノ-6,7-ジヒドロ-5H-シクロペンタ[d]ピリミジン-5-イル)プロピル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸、N-[[5-[2-(2-アミノ-1,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-4-オキノピリド[2,3-d]ピリミジン-6-イル)エチル-2-チエニル]カルボニル]-L-グルタミン酸、(R)-N-[[5-[2-(2-アミノ-1,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-4-オキノピリド[2,3-d]ピリミジン-6-イル)エチル-2-チエニル]カルボニル]-L-グルタミン酸、N-((2,4-ジアミノ-3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロピリド[2,3-d]ピリミジン-6-イル)エチル)-2-チエニルカルボニル-L-グルタミン酸、(S)-2-[[[4-カルボキシ-4-[[4-[[[(2,4-ジアミノ-6-プテリジニル)メチル]アミノ]ベンゾイル]アミノ]ブチル]アミノ]カルボニル]ベンゾイル酸、N-[4-[3-(2,4-ジアミノ-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)プロピル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸、2,4-ジアミノ-6-(N-(4-(フェニルスルホニル)ベンジル)メチルアミノ)キナゾリン、2,4-ジアミノ-5-[4-[3-(4-アミノフェニル-4-スルホニルフェニルアミノ)プロポキシ]-3,5-ジメト

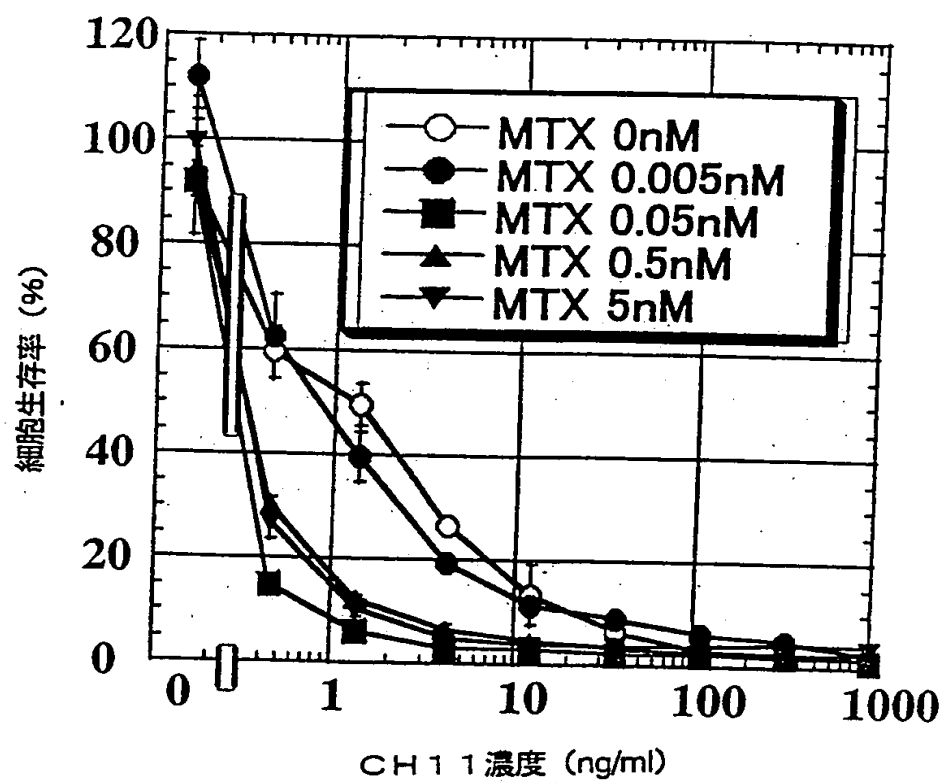
キシベンジル]ピリミジン、N-[4-[4-(2,4-ジアミノ-5-ピリミジニル)ブチル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸、N-[4-[3-(2,4-ジアミノ-5-ピリミジニル)プロピル]ベンゾイル]-L-グルタミン酸、N-[4-[2-(2,4-ジアミノ-6-プテリジニル)エチル]ベンゾイル]-4-メチレン-DL-グルタミン酸およびN-(1-メチルエチル)-N' [3-(2,4,5-トリクロロフェノキシ)プロポキシ]イミドジカルボニミジックジアミドヒドロクロリド (PS 15) からなる群より選択される 1 または 2 以上の化合物であることを特徴とする、請求の範囲第 1 項乃至第 4 項のいずれか一つに記載の医薬組成物。

6. 葉酸拮抗作用またはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有する化合物がメトトレキセートであることを特徴とする、請求の範囲第 1 項乃至第 5 項のいずれか一つに記載の医薬組成物。

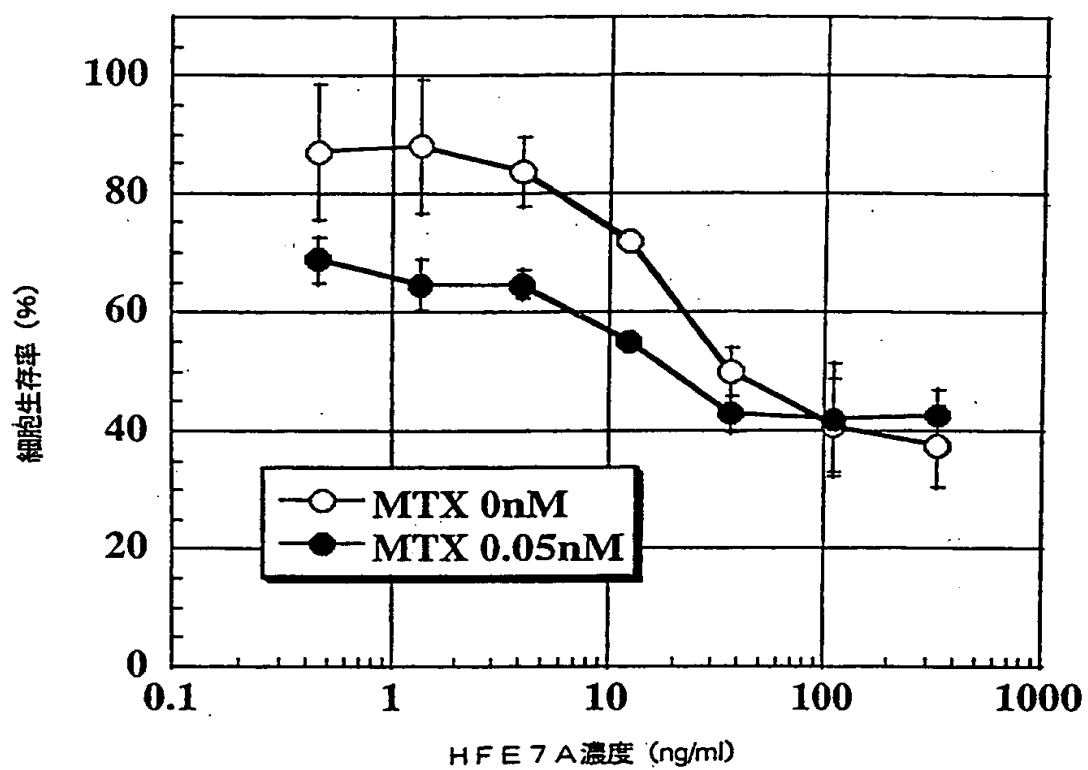
7. 自己免疫疾患または慢性関節リウマチの予防または治療剤である、請求の範囲第 1 項乃至第 6 項のいずれか一つに記載の医薬組成物。

図 面

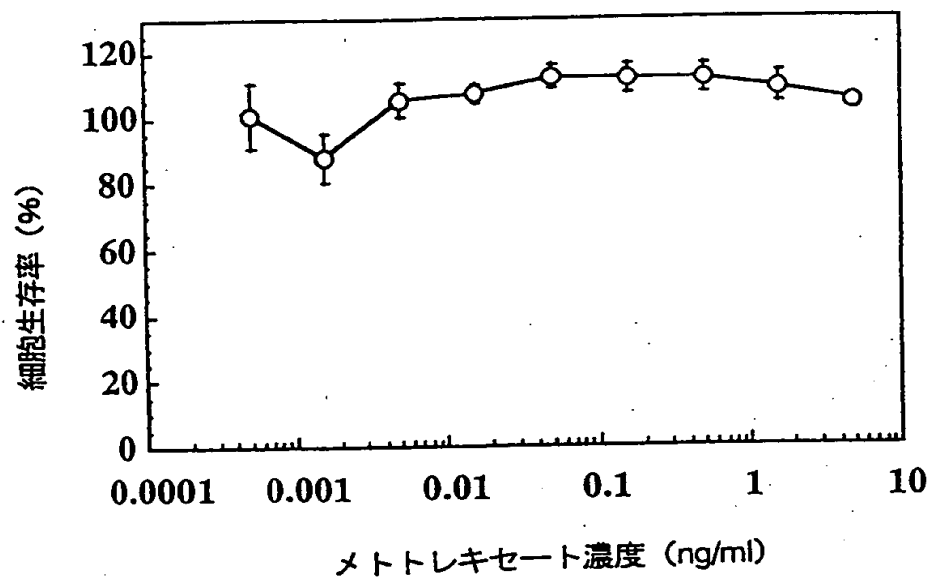
[図 1]



[図 2]



[図 3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03324

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K39/395, 45/00, 31/519, 31/506, 31/517, 31/505, 31/5415, 31/155,
A61P37/06, 29/00, 19/02//C07D475/08,
403/10, 471/04, 239/95, 487/04, 239/48, C07C279/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K39/395, 45/00, 31/519, 31/506, 31/517, 31/505, 31/5415, 31/155,
A61P37/06, 29/00, 19/02//C07D475/08,
403/10, 471/04, 239/95, 487/04, 239/48, C07C279/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),
REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	MIZUTANI, Y. et al., "Sensitization of human bladder cancer cells to Fas-mediated cytotoxicity by cis-diamminedichloroplatinum (II)", JOURNAL OF UROLOGY, 1998, Vol.160, No.2, pp.561-70, especially, page 564, left column, lines 25-39; page 566, left column, lines 11-14	1-3, 6, 4, 5, 7
X Y	MCGAHAN, Anne J. et al., "Chemotherapeutic drug-induced apoptosis in human leukemic cells is independent of the Fas (APO-1/CD95) receptor/ligand system", Br. J. Haematol. 1998, Vol.101, No.3, pp.539-547, especially, Summary, Fig.6, Fig.7, and page 546, right column, lines 15-30	1, 6 2-5, 7
X Y	MIZUTANI, Youichi et al., "Doxorubicin sensitizes human bladder carcinoma cells to Fas-mediated cytotoxicity", Cancer (N. Y.), 1997, Vol.79, No.6, pp.1180-1189 especially, page 1183, left column, lines 17-20	1, 6 2-5, 7
Y	EP, 866131, A2 (Sankyo Company Limited), 23 September, 1998 (23.09.98), the whole document & JP, 10-324699, A	2-5, 7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* "A" Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 22 August, 2000 (22.08.00)	Date of mailing of the international search report 05 September, 2000 (05.09.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03324

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 709097, A1 (SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 01 May, 1995 (01.05.95), Claims & JP, 08-208515, A & US, 6086877, A	2-5,7
Y	EP, 909816, A1 (Sankyo Company Limited), 21 April, 1999 (21.04.99), Claims & JP, 11-171900, A	2-5,7
Y	Nobutoshi SERIZAWA, "Atarashii Kou Fas Monoclonal Koutai niyoruChiryoyakuKaihatsu enoKokoromi", <i>Saishin Igaku</i> , April 1999, Vol.54, No.4, pp.917-924, especially; page 924, left column, lines 1-7	2-5,7
Y	"THE MERCK INDEX, Twelfth Edition", MERCK & CO., INC., WHITEHOUSE STATION NJ, 1996, pp.592-3, 3553.	2-5,7
Y	WO, 92/08461, A1 (PROTOS CORPORATION), 29 May, 1992 (29.05.92), the whole document & EP, 639075, A1 & JP, 07-509215, A	2-5,7
Y	WO, 86/05181, A1 (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY), 12 September, 1986 (12.09.86), the whole document & EP, 215063, A1 & JP, 62-502535, A & US, 4684653, A	2-5,7
Y	EP, 21292, A1 (THE WELCOME FOUNDATION LIMITED), 07 January, 1981 (07.01.81), the whole document & JP, 56-018982, A & US, 4372957, A & US, 4661490, A & US, 4959474, A & US, 4897395, A	2-5,7
Y	"THE MERCK INDEX, Twelfth Edition", MERCK & CO., INC., WHITEHOUSE STATION NJ, 1996, p.1656, 9851	2-5,7
Y	"THE MERCK INDEX, Twelfth Edition", MERCK & CO., INC., WHITEHOUSE STATION NJ, 1996, p.126, 1401	2-5,7
Y	EP, 897724, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 24 February, 1999 (24.02.99), the whole document & WO, 97/34606, A1 & JP, 09-309832, A & US, 6080737, A	2-5,7
Y	KOTAKE, Yoshihiko, "Synthesis and Antitumor Activities of Novel 6-5 Fused Ring Heterocycle Antifolates: N-[4-{.omega.-(2-Amino-4-substituted-6,7-dihydrocyclo penta[d]pyrimidin-5-yl)alkyl}benzoyl]-L-glutamic Acids", <i>J. Med. Chem.</i> , 1994, Vol.37, No.11, pp.1616-24	2-5,7
Y	FAESSEL, Helene M., "Super in vitro synergy between inhibitors of dihydrofolate reductase and inhibitors of other folate-requiring enzymes: the critical role of polyglutamylatation", <i>Cancer Res.</i> 1998, Vol.58, No.14, pp.3036-3050	2-5,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03324

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROSOWSKY, Andre, "Synthesis and biological activity of methotrexate analogs with two acid groups and a hydrophobic aromatic ring in the side chain", J. Med. Chem., 1991, Vol.34, No.2, pp.574-9	2-5,7
Y	EP, 334636, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD.), 27 September, 1989 (27.09.89), the whole document & US, 4997838, A & JP, 02-167281, A & US, 5106974, A & US, 5296600, A & US, 5539113, A	2-5,7
Y	WO, 93/13079, A1 (AGOURON PHARMACEUTICALS, INC.), 08 July, 1993 (08.07.93), the whole document (Family: none)	2-5,7
Y	US, 4912112, A (Saarstickstoff-Fatol GmbH Chem.- Pharm.-Fabrik), 27 May, 1990 (27.05.90), the whole document & DE, 3603577, A1 & EP, 231888, A2 & JP, 62-265272, A	2-5,7
Y	WO, 95/09845, A1 (ELI LILLY AND COMPANY), 13 April, 1995 (13.04.95), the whole document US, 5426110, A & EP, 722440, A1 & JP, 09-503509, A	2-5,7
Y	WO, 91/10666, A1 (NAIR, Madhavan G.), 25 July, 1991 (25.07.91), the whole document & US, 4996207, A & US, 5073554, A & JP, 04-505932, A & EP, 513068, A1	2-5,7
Y	HUGHES, Walter T. et al, "Anti-Pneumocystis carinii activity of PS-15, a new biguanide folate antagonist", Antimicrob. Agents Chemother., 1993, Vol.37, No.7, pp.1417-19	2-5,7
Y	GENESTIER, Laurent et al, "Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells", J. Clin. Invest., 1998, Vol.102, No.2, pp.322-328, especially, Abstract, page 327, right column, lines 9-30	2-5,7
Y	NISHIMURA-MORITA, Yoshiko et al, "Amelioration of systemic autoimmune disease by the stimulation of apoptosis-promoting receptor Fas with anti-Fas mAb", Int. Immunol. 1997, Vol.9, No.12, pp.1793-1799, especially, Abstract	2-5,7
Y	Koushi FUJISAWA et al., "Mouse Kansetsuen ni taisuru Kou Fas Kotai no Chiryo Kouka", Mol. Med. (Tokyo), 1996, Vol.33, No.11, pp.1254-1261, especially, page 1260, left column, line 16 to right column, line 12	2-5,7

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 95/09845, A1 (ELI LILLY AND COMPANY) 13. 4月. 1995 (13. 04. 95) 文献全体 &US, 5426110, A&EP, 722440, A1 &JP, 09-503509, A	2-5, 7
Y	WO, 91/10666, A1 (NAIR, Madhavan G.) 25. 7月. 1991 (25. 07. 91) 文献全体 &US, 4996207, A&US, 5073554, A &JP, 04-505932, A&EP, 513068, A1	2-5, 7
Y	HUGHES, Walter T. et al, "Anti-Pneumocystis carinii activity of PS-15, a new biguanide folate antagonist", Antimicrob. Agents Chemother., 1993, Vol. 37, No. 7, pp. 1417-19	2-5, 7
Y	GENESTIER, Laurent et al, "Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells", J. Clin. Invest., 1998, Vol. 102, No. 2, pp. 322-328, 特に、Abstract, 第327ページ右欄第9-30ページ	2-5, 7
Y	NISHIMURA-MORITA, Yoshiko et al, "Amelioration of systemic autoimmune disease by the stimulation of apoptosis-promoting receptor Fas with anti-Fas mAb", Int. Immunol. 1997, Vol. 9, No. 12, pp. 1793-1799, 特に、Abstract	2-5, 7
Y	藤沢 幸史 等, 「マウス関節炎に対する抗Fas抗体の治療効 果」, Mol. Med. (Tokyo), 1996, Vol. 33, No. 11, pp. 1254-1261, 特に、第1260ページ左欄第16行-右欄12行	2-5, 7
Y	FUJISAWA, Koushi et al, "Therapeutic effect of the anti-Fas antibody on arthritis in HTLV-I tax transgenic mice", J. Clin. Invest., 1996, Vol. 98, No. 2, pp. 271-278, 特に、Abstract	2-5, 7
Y	Sakai, K. et al, "Potential withdrawal of rheumatoid synovium by the induction of apoptosis using a novel in vivo model of rheumatoid arthritis", ARTHRITIS AND RHEUMATISM, 1998, Vol. 41, No. 7, pp. 1251-7, 特に、Summary	2-5, 7
Y	HASUNUMA, Tomoko et al, "Induction of Fas-dependent apoptosis in synovial infiltrating cells in rheumatoid arthritis", Int. Immunol., 1996, Vol. 8, No. 10, pp. 1595-1602 特に、Abstract, 第1596ページ左欄第34-47行	2-5, 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	SUMIDA, Takayuki et al, "Rheumatoid arthritis and apoptosis", Intern. Med., (Tokyo), 1998, Vol. 37, No. 2, pp. 184-188 特に、Introduction	2 - 5, 7
P X	MIZUTANI, Youichi et al, "Effect of anticancer agents on Fas-mediated cytotoxicity against bladder cancer cells", J. Infect. Chemother. 1999, Vol. 5, No. 3, pp. 139-143 特に、第140ページ左欄第26-28行	1, 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)